

Actis Suppo, Romina Florencia

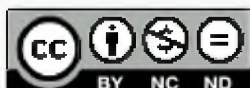
Carranza, María Dolores

identificación de un polimorfismo en el gen TCF7L2 que contribuye a la farmacogenética de la liraglutida en pacientes diabéticos tipo II

Tesis para la obtención del título de grado de
Farmacéutico

Director: Yang, Pablo

Documento disponible para su consulta y descarga en **Biblioteca Digital - Producción Académica**, repositorio institucional de la **Universidad Católica de Córdoba**, gestionado por el **Sistema de Bibliotecas de la UCC**.



Esta obra está bajo licencia 2.5 de Creative Commons Argentina.

Atribución-No comercial-Sin obras derivadas 2.5

Universidad Católica de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas



**IDENTIFICACIÓN DE UN POLIMORFISMO EN EL GEN TCF7L2 QUE CONTRIBUYE
A LA FARMACOGENÉTICA DE LA LIRAGLUTIDA EN PACIENTES DIABÉTICOS
TIPO II**

**Trabajo Final de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de
Córdoba conforme a los requisitos para obtener el título de Farmacéutica.**

Autores

Actis Suppo, Romina Florencia

Carranza, María Dolores

Córdoba

2016

Director de Trabajo Final

Bioq. Yang Pablo

Co-director de Trabajo Final:

Dr. Soria Néstor

Docentes de Trabajo Final

Dra. Carpinella Cecilia

Mag. Zaragoza Mariano Hugo

IDENTIFICACIÓN DE UN POLIMORFISMO EN EL GEN TCF7L2 QUE CONTRIBUYE A LA FARMACOGENÉTICA DE LA LIRAGLUTIDA EN PACIENTES DIABÉTICOS TIPO II

A Dios quien nos guió en nuestras carreras y en estos últimos pasos de las mismas.

A Néstor Soria y Pablo Yang por su dedicación, y por permitirnos aprender al lado de ellos ayudándonos en todo momento de nuestro trabajo.

A todos nuestros profesores, quienes caminaron a nuestro lado transmitiéndonos su sabiduría y enseñándonos a crecer profesionalmente.

A nuestras familias, quienes nos acompañaron con una sonrisa y emoción en momentos positivos y ante una caída allí estuvieron motivándonos como grandes pilares que son.

A nuestros amigos y compañeros, quienes estuvieron con nosotros compartido una etapa maravillosa, dejando una huella en nuestras vidas.

Y a todos aquellas personas que desde algún simple hecho de amabilidad o tan solo con un gesto acompañaron un día más de nuestro paso por la facultad, y fueron parte de este reto de alcanzar la meta que tanto perseguimos, con todo tu sudor y empeño, a todos ustedes simplemente Muchas Gracias!

**IDENTIFICACIÓN DE UN POLIMORFISMO EN EL GEN TCF7L2 QUE CONTRIBUYE
A LA FARMACOGENÉTICA DE LA LIRAGLUTIDA EN PACIENTES DIABÉTICOS
TIPO II**

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Tema.....	1
1.2 Título.....	1
1.3 Problema.....	1
1.4 Hipótesis.....	2
1.5 Marco Teórico.....	2
1.5.1 Páncreas: Anatomía y Fisiología.....	2
1.5.2 Diabetes Mellitus: Generalidades.....	4
1.5.3 Clasificación de Diabetes Mellitus.....	5
1.5.4 Diabetes Mellitus tipo II.....	7
1.5.5 Tratamiento.....	7
1.5.6 Gen implicado en el estudio: TCF7L2.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1 Pacientes en estudio.....	17
3.2 Criterios.....	17
3.3 Muestras.....	18
3.4 Procesamiento de muestras.....	18
3.4.1 Extracción de ADN.....	18

3.4.2 Amplificación del gen mediante PCR.....	20
3.4.3 Digestión enzimática.....	24
RESULTADOS.....	28
CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN.....	30
REFERENCIAS.....	31

IDENTIFICACIÓN DE UN POLIMORFISMO EN EL GEN TCF7L2 QUE CONTRIBUYE A LA FARMACOGENÉTICA DE LA LIRAGLUTIDA EN PACIENTES DIABÉTICOS TIPO II

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina

ARN: Ácido ribonucleico.

ATP: Adenosintrifosfato

DM: Diabetes mellitus.

DMG: Diabetes mellitus gestacional.

DM I: Diabetes mellitus tipo uno.

DM II: Diabetes mellitus tipo dos.

DPP-4: Dipeptidilpeptidasa cuatro.

EDTA: Ácido etilen diamino tetra acético.

GIP: Polipéptido insulínico dependiente de glucosa.

GLP-1: Péptido relacionado al glucagon tipo uno.

HbA: Hemoglobina glucosilada.

IMC: Índice de masa corporal.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PPAR γ : Proliferador de Peroxisomas gamma.

rmp: Revoluciones por minuto.

RSA I: Enzima de restricción empleada en este trabajo.

SUR: Receptor de sulfonilureas.

UV: Ultravioleta.

α : alfa.

β : beta.

IDENTIFICACIÓN DE UN POLIMORFISMO EN EL GEN TCF7L2 QUE CONTRIBUYE A LA FARMACOGENÉTICA DE LA LIRAGLUTIDA EN PACIENTES DIABÉTICOS TIPO II

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figuras</u>	<u>Página</u>
Figura 1: Anatomía del Páncreas	3
Figura 2: Mecanismo de acción de incretinas	11
Figura 3: "Wizard Genomic DNA Purification Kit" (Promega ®)	19
Figura 4: Termociclador Biometra	22
Figura 5: Colocación de las muestras en el Termociclador	23
Figura 6: Enlaces romos	24
Figura 7: Enlaces cohesivos	24
Figura 8: Representación de electroforesis	27
Figura 9: Gel de agarosa teñido con bromuro de Etidio, expuesto a rayos UV para revelar separación de fragmentos de ADN	28
Figura 10: Gel de agarosa teñido con bromuro de Etidio, expuesto a rayos UV para revelar separación de fragmentos de ADN	29

**IDENTIFICACIÓN DE UN POLIMORFISMO EN EL GEN TCF7L2 QUE CONTRIBUYE
A LA FARMACOGENÉTICA DE LA LIRAGLUTIDA EN PACIENTES DIABÉTICOS
TIPO II**

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas	Páginas
Tabla I: Preparación de las muestras de ADN para la amplificación del gen TCF7L2 por PCR	21
Tabla II: Preparación de producto de PCR para su digestión.	25

IDENTIFICACIÓN DE UN POLIMORFISMO EN EL GEN TCF7L2 QUE CONTRIBUYE A LA FARMACOGENÉTICA DE LA LIRAGLUTIDA EN PACIENTES DIABÉTICOS TIPO II

RESUMEN

La Diabetes Mellitus es un desorden metabólico por defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina, que se caracteriza por hiperglucemia crónica con perturbaciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas (Aschener, 2013).

La Diabetes Mellitus tipo II se caracteriza por altos niveles de glucosa en la sangre, debido a una resistencia celular a las acciones de la insulina, afecta principalmente a adultos, y esta aumentado su frecuencia en niños y adultos obesos (Aschener, 2013).

Si bien hay variedad de fármacos para responder al tratamiento de la diabetes, nos centraremos en un grupo más reciente denominado incretinas, estas son hormonas intestinales liberadas en caso de niveles altos de glucosa en sangre y hay de dos tipos GIP Y GLP-1 (Lazo Roblejo y Delgado, 2012).

Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones (Gloyn et al., 2009).

Mediante la técnica de biología molecular: reacción en cadena de la polimerasa y posterior cortes con enzima de restricción (PCR-RFLP) se podría detectar la presencia de pacientes con dichos polimorfismos y evaluar el riesgo de que implica en la terapéutica de los pacientes (Gloyn et al., 2009).

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno del metabolismo, caracterizado por hiperglucemia crónica.

Se basa en un déficit en la secreción y/o actividad de la insulina.

Está condicionada por factores genéticos, ambientales y diversas circunstancias (autoinmunidad, obesidad, infecciones, etc.)

La DM Tipo II es la de mayor prevalencia, y su fisiopatología se debe a una resistencia a la insulina.

1.1 TEMA

Farmacocinética de Incretinas.

1.2 TÍTULO

Identificación de un polimorfismo en el gen TCF7L2 que contribuye a la farmacogenética de liraglutida en pacientes diabéticos tipo II.

1.3 PROBLEMA

¿La presencia de variantes genéticas en pacientes con diabetes tipo II, contribuye al efecto terapéutico de incretinas?

1.4 HIPÓTESIS

La presencia de variantes genéticas condiciona al efecto fármaco terapéutico de incretinas, en pacientes con diabetes tipo 2.

1.5 MARCO TEÓRICO

1.5.1 PÁNCREAS: ANATOMÍA y FISIOLOGÍA

El páncreas es un órgano de forma alargada (12-15 cm de largo) y cónica. Puede pesar hasta 100 gramos. Se encuentra localizado transversalmente en la parte dorsal del abdomen y ubicado en el sistema digestivo y endócrino de los vertebrados, por detrás del estómago. Es, a la vez, una glándula endocrina (produce ciertas hormonas importantes, incluyendo insulina, glucagón y somatostatina), como también exocrina (segrega jugo pancreático que contiene enzimas digestivas que pasan al intestino delgado). Estas enzimas ayudan en la ruptura de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos en el quimo (Patton, 2010).

El páncreas se divide en varias partes:

Cabeza: se encuentra situada en el lado derecho del órgano, es la parte más ancha y se encuentra dentro de la curvatura duodenal (primera parte del duodeno).

Cuello: Anterior a los vasos mesentéricos superiores.

Cuerpo: Es la parte cónica izquierda, continúa posterior al estómago hacia la derecha y se extiende ligeramente hacia arriba.

Cola: Es el final del páncreas y termina cerca del bazo.

Conducto pancreático: Llamado también Conducto de Wirsung. Empieza en la cola dirigiéndose a la derecha por el cuerpo. En la porción inferior de la cabeza se une al conducto colédoco acabando en la ampolla hepatopancreática o de Vater que se introduce en el duodeno descendente (segunda parte del duodeno) (Figura1) (Patton, 2010).

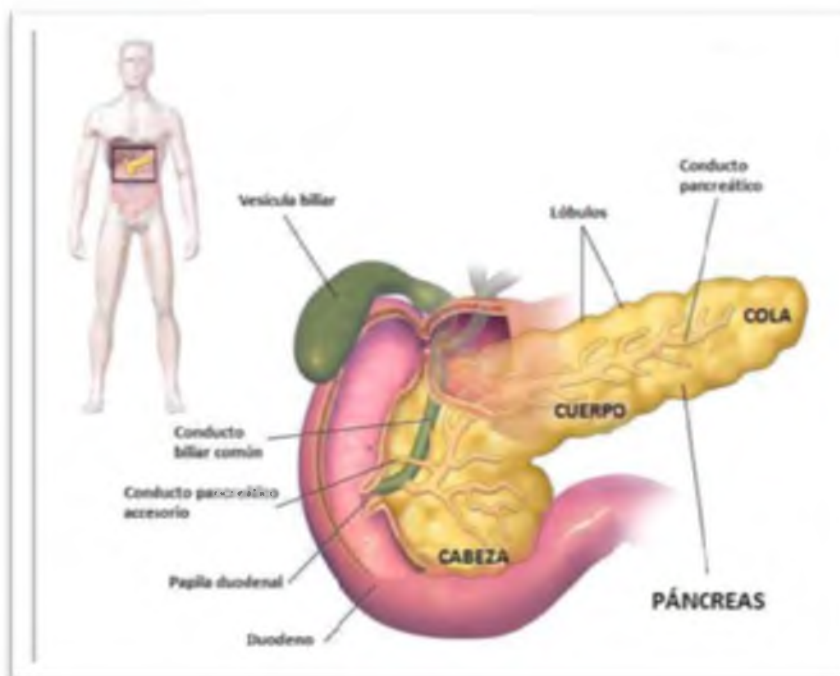


Figura 1: Anatomía del páncreas

El páncreas tiene dos funciones, una endocrina y otra exocrina. La función endocrina es la encargada de producir y segregar la insulina y glucagón (estas hormonas regulan el nivel de glucosa en la sangre) a partir de unas estructuras llamadas islotes de Langerhans. En ellas, las células alfa producen glucagón, una hormona que tiene el efecto exactamente contrario al de la insulina, es hiperglucemiante (eleva el nivel de glucosa en la sangre); las células beta producen insulina, una hormona que regula la cantidad de glucosa en la sangre (disminuye los niveles de glucosa sanguínea). Su misión es facilitar que la glucosa que circula en la sangre penetre en las células y sea aprovechada como

energía. La glucosa se puede considerar como la "gasolina" que hace funcionar al "motor" de nuestro cuerpo. Las células betas "miden" los niveles de azúcar constantemente y entregan la cantidad exacta de insulina para que la glucosa pueda entrar a las células, manteniendo así el azúcar en el rango normal de 70 a 110 mg. El exceso de glucosa es guardado como tejido graso, o en el hígado como glucógeno. Entre comidas, cuando su azúcar en sangre está bajo y las células necesitan combustible, el glucógeno del hígado es convertido en glucosa; y las células delta producen somatostatina (que previene la liberación de las otras dos hormonas) (Patton, 2010).

La función exocrina consiste en la producción de jugo pancreático que se vuelca a la segunda porción del duodeno a través de dos conductos excretores: uno principal llamado Conducto de Varg y otro accesorio llamado Conducto de Maihem (se desprende del principal). Además regula el metabolismo de la grasas. El jugo pancreático está formado por agua, bicarbonato, y numerosas enzimas digestivas, como la Tripsina y Quimotripsina (digieren proteínas), Amilasa (digiere polisacáridos), Lipasa (digiere triglicéridos o lípidos), Ribonucleasa (digiere ARN) y Desoxirribonucleica (digiere ADN). Las enzimas secretadas por el tejido exocrino del páncreas ayudan a la degradación de carbohidratos, grasas, proteínas y ácidos en el duodeno. Estas enzimas son transportadas por el conducto pancreático hacia el conducto biliar en forma inactiva. Cuando entran en el duodeno, se vuelven activas (Patton, 2010).

1.5.2DIABETES MELLITUS: GENERALIDADES

La Diabetes Mellitus (DM) es un desorden metabólico por defectos en la secreción y/o acción de la insulina, que se caracteriza por hiperglucemia crónica con perturbaciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas (Aschener, 2013).

Existen factores de riesgo vinculados a la DM2: índice de masa corporal (IMC) mayor a 25, perímetro de cintura mayor a 80 cm en mujeres y mayor a 90 cm en hombres, antecedente familiar de diabetes, procedencia rural con urbanización reciente, antecedente obstétrico de diabetes gestacional o hijos con peso mayor a 4 Kg al nacimiento, triglicéridos mayor o igual a 150 mg/dl, colesterol HDL menor a 40 mg/dl, hipertensión arterial, enfermedad isquémica coronaria o vascular de origen aterosclerótica, bajo peso al nacer o macrosomía (desarrollo o tamaño excesivo del cuerpo), sedentarismo, enfermedades asociadas (deterioro cognitivo, déficit de audición, esquizofrenia, cánceres, esclerosis hepática) y síndrome de ovario poliquístico, entre otros (Aschener, 2013).

1.5.3 CLASIFICACIÓN DE DIABETES MELLITUS

La base de la clasificación de la DM, se fundamenta en su etiología y características fisiopatológicas, abarcando cuatro grupos:

- Diabetes Mellitus tipo I (DM I): Se trata de una deficiencia absoluta de insulina, debido a la destrucción de las células β pancreáticas. Sus primeras manifestaciones clínicas suelen ocurrir alrededor de la pubertad, cuando ya la función se ha perdido en alto grado, siendo la insulinoterapia totalmente necesaria para la sobrevivencia del paciente. A pesar de ello, la diabetes mellitus tipo I puede manifestarse en etapas tempranas de la vida adulta, progresando lentamente y no siendo necesaria la insulina en sus estadios iniciales, conociéndose estos casos como Diabetes autoinmune latente del adulto (LADA) (Aschener, 2013).

- Diabetes Mellitus tipo II (DM II): Este tipo de diabetes afecta principalmente a adultos, sin embargo, su frecuencia está aumentando en niños y adolescentes obesos.

Se presenta con grados variables de resistencia a la insulina, requiriendo una deficiencia en la producción de la misma predominante o no (Aschener, 2013).

Ambos fenómenos deben estar presentes en algún momento para una elevación de la glucemia (Aschener, 2013).

Aunque existen marcadores clínicos que indiquen con precisión cuál de los dos defectos primarios predomina en cada paciente, el exceso de peso sugiere la presencia de resistencia a la insulina, mientras que la pérdida de peso sugiere una reducción progresiva en la producción de la hormona (Aschener, 2013).

Fisiopatológicamente podemos clasificar a la DM II en:

- a) Predominante insulinoresistente con deficiencia relativa de la insulina.
- b) Predominante con un defecto secretor de la insulina con o sin resistencia a la misma.

- Diabetes mellitus gestacional (DMG): Es la alteración del metabolismo de los hidratos de carbono de severidad variable, que se inicia o reconoce durante el embarazo.

- Otros tipos específicos de Diabetes mellitus: Defectos genéticos de la célula β , defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías inducidas por drogas o químicos, infecciones, formas poco comunes de Diabetes mediadas inmunológicamente y otros síndromes genéticos (Aschener, 2013).

1.5.4 DIABETES MELLITUS Tipo II

La DM II en Latinoamérica es uno de los mayores problemas para los sistemas de salud. Alrededor de 26 millones de adultos con Diabetes residen en esta región, esperando para el año 2030 un incremento de la patología y siendo aproximadamente 39,9 millones los afectados, a causa de la obesidad, la intolerancia a la glucosa y en un porcentaje elevado de pacientes el desconocimiento de tal condición (Aschener, 2013).

La DM se encuentra entre las primeras cinco causas de mortalidad y esto se debería a cardiopatías isquémicas e infartos cerebrales. Además, la diabetes es la primera causa de ceguera, insuficiencia renal, amputaciones no debidas a traumas e incapacidad prematura, se encuentra entre las diez primeras causas de hospitalización y solicitud de atención médica (Aschener, 2013).

1.5.5 TRATAMIENTO

Tras la aplicación de un tratamiento para la DM II, los objetivos propuestos son: controlar la hiperglucemia, evitar o retrasar las complicaciones crónicas: microangiopáticas (nefropatía, retinopatía y neuropatía) y macroangiopáticas (enfermedad cerebrovascular, artropatía periférica, cardiopatías isquémica), evitar descompensaciones agudas, disminuir la tasa de mortalidad y mantener una calidad de vida óptima (Llanes, 2002).

Es fundamental considerar ciertas conductas que acompañan el tratamiento farmacológico como: cambios en el estilo de vida (modificación en la dieta, ejercicio físico, educación sobre la importancia de la enfermedad, abstención de fumar, entre otros), que son el punto de partida a la hora de tratar la hiperglucemia (Llanes, 2002).

La pérdida de peso, con dieta hipocalórica, baja en grasas saturadas, hidratos de carbono y sal, y con aumento del ejercicio físico, tiene gran importancia en el control de la hiperglucemia; de todas maneras en muchos casos es necesaria la administración de fármacos hipoglucemiantes (Llanes, 2002).

Los fármacos hipoglucemiantes actúan por diferentes mecanismos y se agrupan estableciendo los diferentes grupos terapéuticos. Ellos son:

- SULFONILUREAS: Estimulan la secreción de insulina mediante la unión al receptor de membrana SUR (receptor de sulfonilureas), bloqueando los canales K_{ATP} en las células β y de esta manera estimulan los efectos que la glucosa induce sobre la secreción de insulina) (García Barrado y Iglesias, 2008).

- ANÁLOGOS DE LAS MEGLITINIDAS: Actúan cerrando canales de K_{ATP} y el sitio de unión de éstos fármacos es el SUR. De esta forma, inducen a la reducción de la glucemia y de la hemoglobina glucosilada similar a la observada en las sulfonilureas (García Barrado y Iglesias, 2008).

- BIGUANIDAS: Estos fármacos no actúan directamente sobre las células β pancreáticas, se encargan de reducir la gluconeogénesis hepática y, en menor medida, la glucogenólisis, potencia los efectos de la insulina en los tejidos adiposo y muscular y disminuye la absorción intestinal de la mucosa (García Barrado y Iglesias, 2008).

- INHIBIDORES DE LAS α -GLUCOSIDASAS: Actúan inhibiendo en forma reversible las enzimas α -glucosidasas del borde de la pared intestinal retrasando la digestión de los hidratos de carbono complejos y disacáridos, a monosacáridos fácilmente absorbibles, como la entrada de glucosa en la circulación esta enlentecida, la célula β se encuentra en mejores condiciones de responder liberando insulina frente a una concentración de glucosa menos elevada (García Barrado y Iglesias, 2008).

- GLITAZONAS: Son agonistas de $PPAR\gamma$ y se unen a dicho receptor en los adipocitos preferentemente, pero también en el músculo y el hígado. Inducen la expresión de diferentes genes que participan en acciones de la insulina.

Las glitazonas, aumentan los niveles de HDL y LDL y en consecuencia de su acción adipogénica, producen incremento de peso (García Barrado y Iglesias, 2008).

- IMIDAZOLINAS: Están relacionadas con los bloqueantes α_2 -adrenérgicos. Ejercen su acción farmacológica estimulando la secreción de insulina al bloquear el canal K_{ATP} , pero en lugares distintos a las sulfonilureas y/o activando proteincinasas (PKA, PKC) (García Barrado y Iglesias, 2008).

- INCRETINAS: son hormonas intestinales liberadas al torrente circulatorio en respuesta a la ingestión de nutrientes, participando en la homeostasia de la glucemia, regulando la secreción de insulina y glucagón de manera dependiente de glucosa (Lazo y Delgado, 2012).

Se han identificado dos incretinas principales, las cuales provocan el 50% de la secreción de insulina por el páncreas. Ellas son:

- GIP (polipéptido insulíntrópico dependiente de glucosa), polipéptido de 42 aminoácidos producido en las células K intestinales situadas principalmente en el duodeno y yeyuno.
- GLP-1 (péptido relacionado al glucagón tipo I), un polipéptido de 30 aminoácidos liberado por las células L intestinales ubicadas en duodeno, íleon e intestino grueso.

Ambas hormonas ejercen sus efectos a través de los receptores acoplados a proteína G. Los receptores de GLP-1 se expresan en las células alfa y beta de los islotes del páncreas, del sistema nervioso central y periférico, corazón, riñón, pulmón, tejido adiposo y tracto gastrointestinal; mientras que los receptores GIP lo hacen en los islotes pancreáticos, en tejido adiposo y cerebro (Lazo y Delgado, 2012).

Al unirse al receptor acoplado a proteína G, tanto la GLP-1 como la GIP producen un aumento del monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) intracelular y activan la proteincinasa A, la cual cierra los canales de potasio sensibles al

adenosíntrifosfato (ATP) y, al mismo tiempo, induce a un incremento de la concentración de calcio intracelular con la consecuente realización de innumerables reacciones hipoglucemiantes (Lazo y Delgado, 2012).

Si consideramos el efecto de estas incretinas, la GLP-1 produce un mejoramiento en la sensibilidad a la glucosa de las células alfa y beta estimulando además, sólo en casos de hiperglucemia, la secreción de insulina; disminuye la glucosa plasmática postprandial y en ayunas; inhibe la secreción de glucagón (excepto en casos de hipoglucemia); disminuye la hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}); enlentece el vaciado gástrico y actúa en el hipotálamo produciendo sensación de saciedad reduciendo la ingesta alimentaria; en el sistema cardiovascular tiene acciones protectoras sobre el mismo, acciones directas con el aumento del efecto inotrópico y de la captación de glucosa por los cardiomiocitos, mejorando el pre acondicionamiento isquémico (Lazo y Delgado, 2012).

La GLP-1 se caracteriza por inhibir la apoptosis de las células beta, aumentando su proliferación y la inducción a su producción (Lazo y Delgado, 2012).

La GIP en cambio, no influye sobre la secreción de glucagón ni del vaciado gástrico. Ejerce efectos estimuladores sobre la secreción de insulina dependiente de glucosa y potencia la supervivencia y proliferación de las células alfa (Lazo y Delgado, 2012).

El efecto insulíntrófico de ambas hormonas es directamente proporcional y dependiente de las concentraciones de glucosa en plasma. De esta manera concluimos que a mayor valor de glucemia mayor será el efecto de las incretinas creando un mecanismo protector contra la hipoglucemia (Lazo y Delgado, 2012).

Tanto la GLP-1 como la GIP tienen una vida media muy corta y son degradadas por la enzima DPP-4 (dipeptidilpeptidasa 4), originando péptidos inactivos biológicamente (Figura 2).

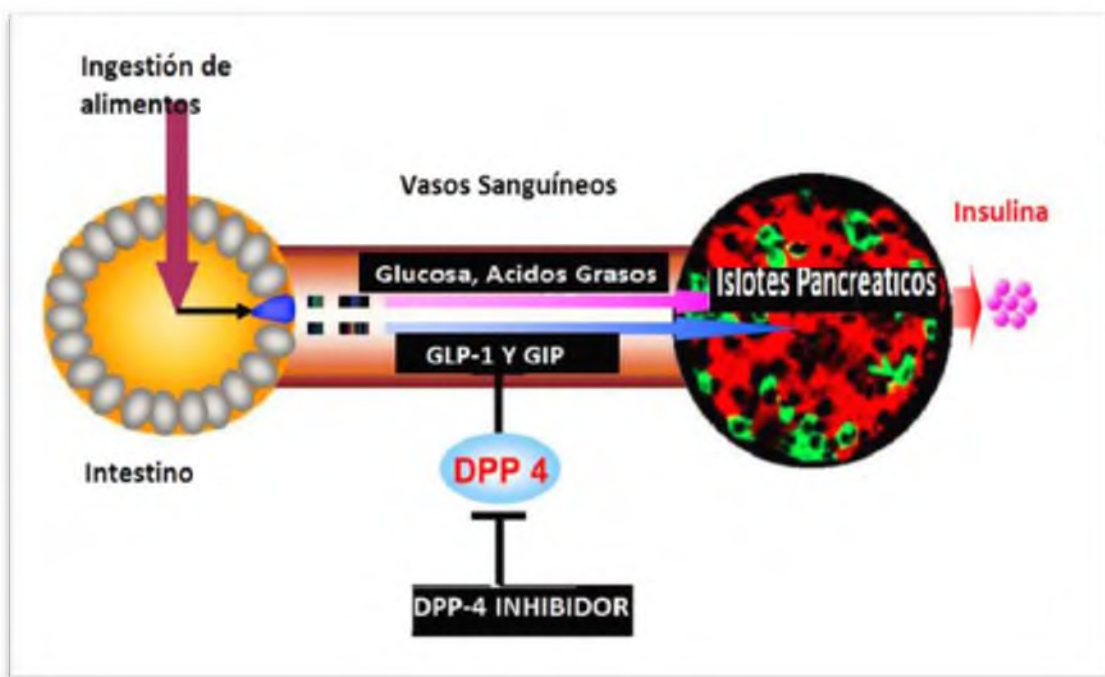


Figura 2: Mecanismo de acción de incretinas.

En los pacientes diabéticos tipo II, la producción y secreción de GLP-1 se encuentran disminuidas, mientras que las concentraciones de GIP son normales. Por tal motivo, la farmacoterapia se ha centrado en la GLP-1 (Lazo y Delgado, 2012).

Existen dos estrategias terapéuticas que actúan sobre el sistema de incretinas. Una está dirigida a reproducir el efecto de estas hormonas por medio de la utilización de agonistas GLP-1 y la otra consiste en potenciar la acción de las incretinas endógenas mediante la incorporación de los inhibidores de la DPP-4 (Lazo y Delgado, 2012).

Los agonistas GLP-1 actúan sobre los receptores GLP-1 y presentan una secuencia similar a la hormona natural, pero con mayor resistencia a la degradación por la enzima DPP-4. En este grupo incluiremos a los fármacos exenatida y liraglutida (Lazo y Delgado, 2012).

Los inhibidores de la DPP-4 se unen a la enzima DPP-4 e inhiben de forma reversible la hidrólisis de las incretinas endógenas, aumentando los niveles tanto de GIP como de GLP-1, así como también la potenciación de su acción, lo que conlleva al incremento de la respuesta insulínica y la disminución de la secreción de glucagón. Los fármacos pertenecientes a este grupo son la sitagliptina y la vildagliptina (Lazo y Delgado, 2012).

Exenatida: este fármaco se une y activa al receptor de GLP-1, su mecanismo de acción está mediada por AMP cíclico y otras vías de señalización intracelular, este fármaco incrementa la secreción de insulina por células pancreáticas (Ascaso, 2013).

Luego de su administración por vía subcutánea, alcanza su concentración plasmática media aproximadamente a las 2 horas. Es eliminada principalmente por excreción glomerular luego de su degradación proteolítica (Ascaso, 2013).

Liraglutida: su mecanismo de acción es mediado a través de la interacción específica con los receptores GLP-1 generando un incremento del AMP cíclico. Estimula la secreción de insulina y disminuye la de glucagón de un modo glucosa dependiente (Ascaso, 2013).

Su administración es por vía subcutánea, perdurando su acción durante 24 horas y alcanzando su máxima concentración a las 8-12 horas de su aplicación. Su absorción parenteral es lenta y la biodisponibilidad es del 55%. Presenta una elevada unión (mayor al 98%) a proteínas plasmáticas. Se metaboliza de modo similar a las grandes proteínas sin que se haya identificado un órgano específico como ruta principal de eliminación. Su vida media de eliminación es aproximadamente de 13 horas (Ascaso, 2013).

Vildagliptina: es un hipoglucemiante oral que origina un aumento de los niveles endógenos postprandiales y en ayunas de las hormonas GLP-1 y GIP; con ello potencia el aumento del cociente insulina/glucagón durante la hiperglucemia, disminuyendo la liberación hepática de glucosa con la fase

postprandial o en ayunas, consiguiendo de esta forma disminuir la glucemia (Ascaso, 2013).

Se absorbe rápidamente logrando una biodisponibilidad del 85%, tiene una baja unión a proteínas (9,3%) y el metabolismo es su principal vía de eliminación siendo su excreción por orina del 85% y por heces del 15%. Su vida media es de aproximadamente 3 horas (Ascaso, 2013).

Sitagliptina: Su farmacodinamia es igual a la anterior.

La biodisponibilidad absoluta es aproximadamente del 87%, su distribución es en parte unida reversiblemente a proteínas plasmáticas (38%). El 79% es excretada sin cambios a través de orina, mientras que el metabolismo es una vía menor de eliminación (Ascaso, 2013).

El tratamiento basado en el efecto incretina es uno de los más novedosos, y parecería tener diversos beneficios, incluyéndose entre ellos un efecto hipoglucemiante comparable al de los tratamientos clásicos establecidos desde hace años (metformina, sulfonilureas, meglitinidas, etc.), siendo más potente los análogos de GLP-1 que los inhibidores de la DPP-4, escaso riesgo de hipoglucemias, sin aumento de peso y disminución con los análogos de GLP-1. Falta por demostrar su efecto beneficioso en la prevención de patologías cardiovasculares y no está del todo claro si pueden prevenir la progresión de la enfermedad. Sin embargo, es de relevada importancia tener en cuenta sus ventajas, ya que corrigen los defectos fisiopatológicos de la DM2, poseen un efecto hipoglucemiante potente y similar al de los tratamientos ya establecidos, además no influyen en variaciones del peso corporal (Ascaso, 2013).

El tratamiento hipoglucemiante no solo es complejo, sino que puede relacionarse con sucesivos efectos perjudiciales, como son:

- Disminución del número y función de las células beta pancreáticas. Esto se relaciona con múltiples factores como son la existencia de polimorfismos

asociados a la disfunción de la célula beta y masa celular, la lipotoxicidad por aumento plasmático de ácidos grasos libres y su depósito intracelular, la glucotoxicidad que también interviene en el deterioro de las células beta.

- Riesgo a episodios de hipoglucemias, que en personas con diabetes evolucionada y sumado un deterioro vascular, pueden provocar episodios cardiovasculares con riesgo de mortalidad.

- Aumento de peso que puede agravar la obesidad, la resistencia a la insulina la hiperglucemia y evolución de la diabetes.

Como se ha descrito son muchos los fármacos que existen para tratar la DM2. Sin embargo no contamos con un fármaco ideal, que sería aquel capaz de normalizar la glucemia sin provocar efectos secundarios como los anteriormente mencionados (Ascaso, 2013).

El tratamiento farmacológico debe ser personalizado teniendo en cuenta diferentes puntos: potencial hipoglucémico, equilibrio riesgo-beneficio y cambios en el peso (Ascaso, 2013).

1.5.6 GEN IMPLICADO EN EL ESTUDIO: TCF7L2

Como ya se ha desarrollado anteriormente, la Diabetes tipo II es una patología asociada a diversos factores, entre ellos los genéticos. Diversas exploraciones sobre el genoma han demostrado que aproximadamente son 20 los genes asociados a la susceptibilidad de desarrollar Diabetes Mellitus tipo II (Gloyn, 2009).

TCF7L2 es el gen con mayor efecto sobre la susceptibilidad a desarrollar DM II, y otras patologías como cáncer de colon rectal. Se trata de una proteína que actúa como factor de transcripción. La misma está vinculada a diversas funciones entre ellas, intervenir en el proceso de transcripción y ser miembro de

la “vía de señalización Wnt” (conjunto de vías implicadas en la traducción de señales desde el exterior celular hacia el interior celular) (Gloyn, 2009).

Tras la realización de diversos estudios, recientemente se logró descubrir que polimorfismos de este gen mostraron tener riesgo genético más fuerte, siendo uno de los de mayor interés la variante: rs7903146 (Zimdahl et al., 2013).

Por diferentes mecanismos, este polimorfismo aumentaría el riesgo de diabetes y afectaría la respuesta al tratamiento farmacológico, tanto en la inducción de secreción de insulina como así también en alteraciones de glucagón y péptidos similares a él (Zimdahl et al., 2013).

2. OBJETIVOS

Generales:

- Buscar una variante genética en pacientes con diabetes tipo II, que contribuya a la efectividad de la liraglutida.

Específicos:

- Realizar una puesta a punto de una técnica para la identificación del polimorfismo rs7903146, en el gen TCF7L2.
- Analizar la presencia de un polimorfismo en un gen asociado con la farmacocinética de Incretinas.

3. MATERIALES y MÉTODOS

3.1 PACIENTES EN ESTUDIO

El estudio incluyó diez pacientes con diagnóstico previo de DM2, que asistieron al servicio de diabetología del Hospital Nacional de Clínicas de la ciudad de Córdoba con el fin de realizar análisis de control de diabetes.

Los sujetos participantes debieron proporcionar su Consentimiento Informado firmado y de acuerdo con la declaración de Helsinki (este proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Nacional de Clínicas de la ciudad de Córdoba y el Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba).

3.2 CRITERIOS

Se siguieron los siguientes criterios para la incorporación o no de los pacientes según:

Criterios de inclusión: individuos mayores de 18 años, con diagnóstico clínico de DM2, con conocimiento de medicamentos, terapias y dosis recibidas por el paciente.

Criterios de exclusión: pacientes que no posean DM2, o que se encuentren participando de otros estudios.

3.3 MUESTRAS

Las muestras analizadas consistieron en:

- Sangre entera con anticoagulante EDTA obtenida por venipuntura en tubos BD Vacutainer® EDTA-K2 5.4 mg.
- ADN de sangre entera con anticoagulante EDTA obtenida por venipuntura en tubos BD Vacutainer® EDTA-K2 5.4 mg, extraído según el método indicado por el kit comercial "Wizard® DNA Purification Kit" (Cat. #A1120, Promega).
- Los pacientes se presentaron con 12 horas de ayuno.

3.4 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

3.4.1 Extracción de ADN

Se utilizó el "Wizard® DNA Purification Kit" (Cat. #A1120, Promega) (Figura 3).

El Wizard® DNA Purification está diseñado para la separación de ADN de los glóbulos blancos, tejidos de cultivos celulares, tejido animal y vegetal, levaduras y bacterias Gram positivo y negativos.

Este kit se basa en un proceso de 4 pasos: lisis celular, lisis nuclear, remoción de proteínas celulares mediante un precipitante y, concentración y

desalinización del ADN mediante precipitación con isopropanol y lavado con etanol 70%.



Figura 3:"Wizard Genomic DNA Purification Kit" (Promega ®).

Procedimiento: 150µl de sangre anticoagulada se lisaron con Cell Lysis Solution y Nucleic Lysis Solution. Luego, se centrifugó la muestra y se descartó el sobrenadante. Para la extracción del ADN se utilizaron distintas soluciones provistas por el fabricante (RNase Solution, Protein Precipitation Solution) con posteriores centrifugaciones breves a 13.000 r.p.m. y para la precipitación del mismo se utilizó Isopropanol y Etanol 70%. Por último, el ADN extraído se resuspendió en DNA Rehydration Solution.

3.4.2 Amplificación del gen mediante PCR

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es un método que se basa en el uso de la capacidad de la ADN polimerasa para sintetizar una nueva

cadena de ADN complementaria a una cadena molde ofrecida. Debido a que la enzima puede añadir un nucleótido solamente en un grupo 3'-OH preexistente, se necesitan primers a los cuales se añade el primer nucleótido. Esto hace que sea posible delimitar una región específica de la secuencia molde que el investigador desea amplificar. Una vez finalizada la reacción de PCR la secuencia específica se acumula en miles de millones de copias (Rostan, 2014).

Procedimiento: Al ADN extraído se le realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y para esto se tomó 1 µl de muestra de ADN, 3 µl de Colorless Reaction Buffer Taq 5x (Promega™), 0.12 µl de dNTPs (10 mM, Promega™), 0.12 µl de GoTaq Polimerasa® (5 U/ µl, Promega™), 1 µl de Primer Forward correspondiente, 1 µl de Primer Reverse correspondiente y se llevó a volumen final 15 µl con agua bidestilada calidad biología molecular.

Fragmento de secuencia del gen en estudio:

```
GAGAGCTAAGCACTTTTGTAGGTAYTATATAATTTAATTGCCGTATGAGGCACCCTTAGTTTTTCAGACGA
GAAACCACAGTTACAGGGAAGGCAAGTAACTTAGTCAATGTCAG
```

En cuanto a la secuencia mostrada anteriormente, identificamos en ella en color gris la secuencia correspondiente a los primers utilizados.

Se amplificó un producto de 113 pares de bases. Identificaremos el polimorfismo representado con la letra Y de color verde. En su lugar encontraremos una C en caso de que la secuencia no contenga mutación y por lo tanto sea normal; de lo contrario, encontraremos una T indicando la mutación del gen y en consecuencia la presencia de la variante de interés rs7903146.

Secuencias de primers utilizados:

-Forward: 5'- GAGAGCTAAGCACTTTTTAGGTA -3'

-Reverse: 5'- CTGACATTGACTAAGTTACTTGC -3'

Tabla I: Preparación de las muestras de ADN para la amplificación del gen TCF7L2 por PCR.

	x1	x13
H ₂ O bidestilada	14,60 µl	189,8 µl
Buffer Taq 5X	5 µl	65 µl
Primer F (10pmol/µl)	1,67 µl	21,71 µl
Primer R (10pmol/µl)	1,67 µl	21,71 µl
dNTPs (10pmol/µl)	0,20 µl	2,60 µl
Gotaq Polimerasa (5 U/µl)	0,20 µl	2,60 µl
ADN	1,7 µl	22,1 µl
Volumen Final	23,33 µl	303,29 µl

Se realizaron de la siguiente manera:

- a) Inicio: a 94° C por 5 minutos
- b) Desnaturalización: a 94° C por 1 minuto
- c) Hibridación: a 60° C por 1 minuto
- d) Extensión: a 72° C por 1 minuto
- e) Elongación Final: a 72° C por 10 minutos
- f) Conservación: a 20° C

Tiempo de duración: 2.35 horas.

Se repitió cíclicamente las fases b-c-d por 35 veces.

Se utilizó termociclador Biometra®. (Figura 4 y 5)



Figura 4: Termociclador Biometra



Figura 5: Colocación de las muestras en el Termociclador.

Separación del producto de amplificación:

Gel de agarosa al 1,2 % p/v

Buffer: TAE (tris acetato EDTA) 80 ml [1x] + Bromuro de etidio (colorante)
2 μ l, 10mg/ml, Promega).

Voltaje: 70-80 V

Tiempo: 45' - 1h.

Tamaño del fragmento amplificado

-Fragmento: 113 pares de bases.

3.4.3 Digestión enzimática

Una enzima de restricción, llamada también endonucleasa, es aquella capaz de reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortarlo en ese punto concreto (sitio de restricción), o en un sitio no muy lejano a este. Reconocen entre 4- 12 pares de bases de ADN (Iniesta et al., 2005).

El mecanismo de corte de ADN se realiza gracias a la ruptura de enlaces fosfodiésters en la doble hebra, lo que da lugar a dos extremos de ADN. Estos pueden ser romos cuando los enlaces rotos coinciden (Figura 6) o cohesivos. Estos últimos tienen tendencia a volver a unirse, ya que los extremos se pueden unir a otros coincidentes que pueda haber en la cercanía (Figura 7) (Iniesta et al., 2005).

La importancia clínica que han tomado las enzimas de restricción ha sido por su implicancia en el diagnóstico de enfermedades genéticas relacionadas a cambios en la secuencia de ADN, ya sean mutaciones puntuales, inserciones o deleciones de fragmentos. Si estas se producen en un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción, al producirse eliminarán o agregarán nuevos sitios de corte. Al aplicar esta enzima un fragmento del gen será digerido, ya que la misma reconocerá la secuencia específica de ADN, formándose de esta manera fragmentos de distintas longitudes, otorgando como resultado un patrón de bandas a través del mismo se podrá relacionarlo a un tipo de genotipo en particular (mutado, heterocigota o normal) (Iniesta et al., 2005).



Figura 6: Enlaces romos



Figura 7: Enlaces cohesivos

En nuestro trabajo la enzima de restricción utilizada es: Rsa I , a la cual se le otorgó condiciones óptimas para que ejerza su acción (37° C – 3 horas), y luego se sometió a un proceso de electroforesis correspondiente sembrando el producto de digestión en gel de agarosa (Agarosa MAX D1 Max Biología Molecular® 100g, Biodynamics™ SRL) al 2,5% P/V en buffer TAE (1X) y tinción con 2 ml de Solución de Bromuro de Etidio calidad biología molecular (10 mg/ml, Promega™). En la corrida electroforética se utilizaron marcadores de peso molecular (MPM) de 100 pb (CienMarker® 250uL, Biodynamics™), fuente de poder BioRAD® (PowerPac Basic™) a 70V por 40 minutos. El gel fue sometido a rayos UV para poder analizar los resultados, pudiendo obtener las siguientes situaciones: Si la muestra pertenece a un individuo sano (sin mutación en la secuencia del gen), la enzima actuará cortando a la misma en dos fragmentos (uno de 91 y otro de 22 pares de bases); mientras que si la muestra pertenece a un individuo con mutación en el gen de interés, la enzima no cortará y por lo tanto no se observará división de fragmentos en su secuencia (Figura 8) (Inieta et al., 2005).

Tabla II: Preparación de producto de PCR para su digestión

	x1	x13
H ₂ O bidestilada	5,3µl	68,9µl
Buffer (10X)	1,5 µl	19,5µl
Enzima de restricción (Rsa I, 10 U/µl)	0,2 µl	2,6µl
Producto de amplificación	8 µl	104µl
Volumen Final	15 µl	195µl

Digestión

Temperatura: 37° C.

Tiempo: 3 hs.

Sitio de corte:

5'...GTAC...3'
3'...CATG...5'

Separación del producto de digestión

Gel de agarosa al 2,5% p/v.

Buffer: TAE [1X]

Voltaje: 80V

Tiempo: 45' - 1h.

Interpretación

Homocigota C/C: 91 y 22 pb

Homocigota T/T: 113 pb

Heterocigota C/T: 91, 22 y 113 pb

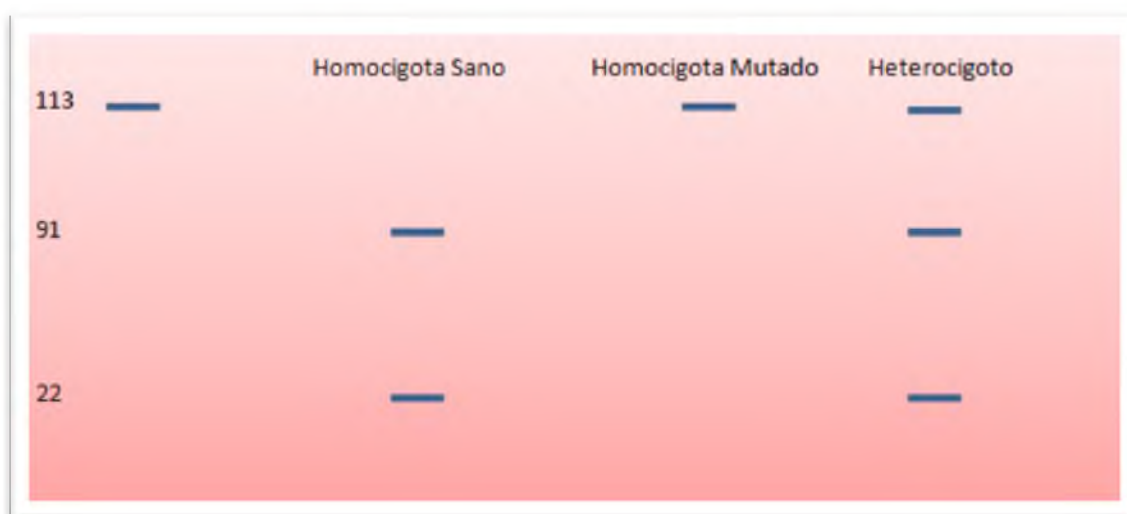


Figura 8: Representación de electroforesis.

4. RESULTADOS

Luego de haber finalizado con nuestro trabajo, y después de concretar con la técnica propuesta (PCR) para el análisis de las diferentes muestras, pudimos diferenciar las secuencias de nucleótidos pertenecientes tanto a individuos normales (sanos) como aquellas correspondientes a individuos mutados (con presencia del polimorfismo de interés), ya que gracias a la misma y por la diferencia de tamaños en los fragmentos nos permitió arribar a los resultados deseados y pudiendo de esta manera cumplir con nuestro objetivo de identificar una variante genética (Figura 9 y 10).

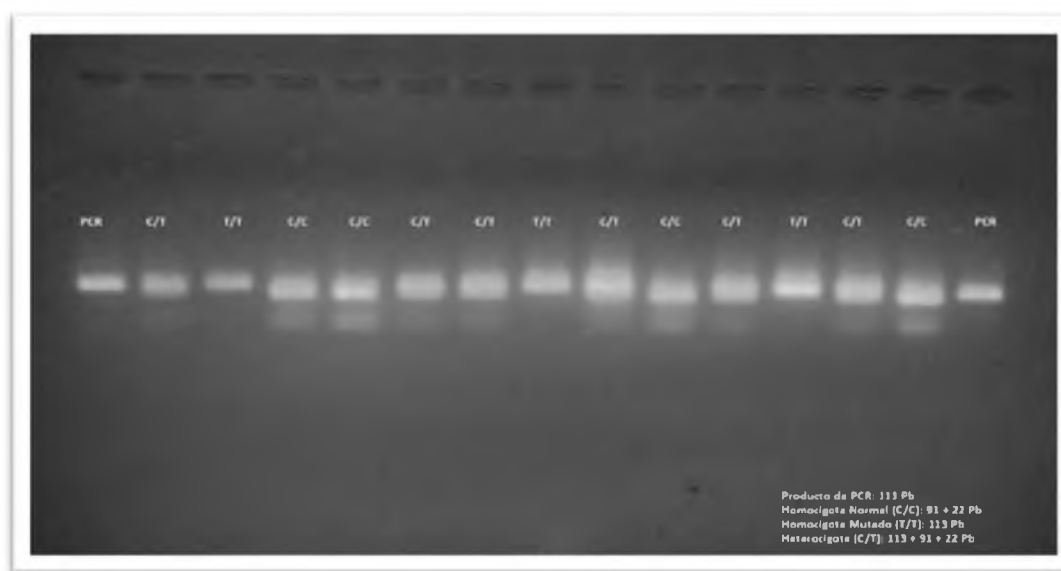


Figura 9: Gel de agarosa teñido con bromuro de Etidio, expuesto a rayos UV para revelar separación de fragmentos de ADN.

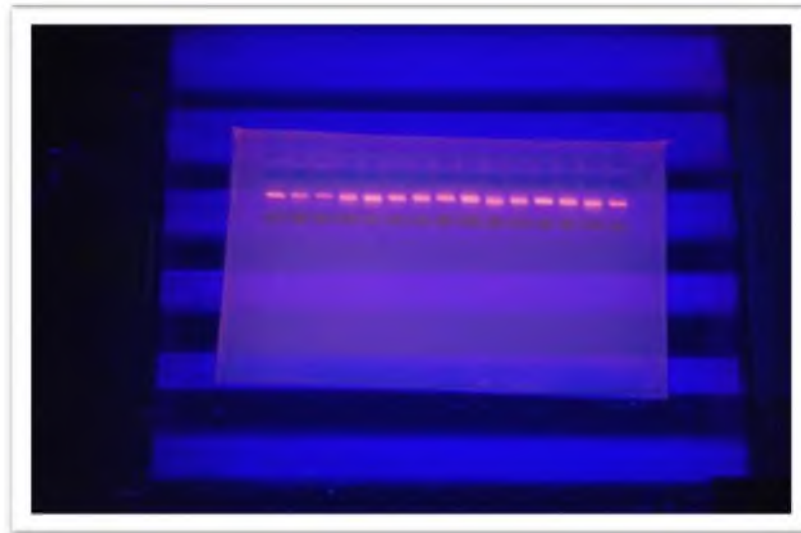


Figura 10: Gel de agarosa teñido con bromuro de Etidio, expuesto a rayos UV para revelar separación de fragmentos de ADN.

5. DISCUSIÓN y CONCLUSIÓN

Una vez llevada a cabo la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), logramos alcanzar nuestro objetivo inicialmente propuesto, es decir, la identificación del polimorfismo rs7903146 perteneciente al gen TCF7L2, en pacientes diabéticos tipo II.

Además logramos comprobar que la técnica luego de su puesta a punto realmente fue efectiva. A pesar de esto, debemos destacar que por no haber sido representativo el número de muestras con el cual trabajamos, además de no haber sido tema relevante en el estudio dosis de fármacos ni efectividad en tratamiento terapéutico, no podremos afirmar que la presencia del polimorfismo tendrá influencia directa en el tratamiento farmacológico con incretinas y tampoco en el transcurso de la enfermedad.

Con un enfoque al futuro y teniendo presente nuestro alcance podemos decir que nuestro trabajo será de gran interés si pudiera ser aplicado en el diagnóstico temprano de la Diabetes Mellitus tipo II para poder de esta manera evitar errores en la prescripción de ciertos fármacos y en consecuencia retrasar la aparición de las diferentes complicaciones optando así por un tratamiento más efectivo y seguro que logre mejorar la calidad de vida del paciente.

6. REFERENCIAS

Ascaso, J., Diabetes mellitus tipo II: nuevos tratamientos. MedClin [revista en la Internet]. Mayo 2013. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2013.05.041>.

Aschener P., ALAD Guías sobre diagnóstico y tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo II con medicina basada en evidencia. 2013 (142). Disponible en: URL: <http://www.aladlatinoamerica.org/>.

García-Barrado M., Iglesias M.C., Moratinos. Fármacos antidiabéticos. Insulinas y antidiabéticos orales. En: Farmacología Básica y Clínica. Lorenzo P., Velázquez B., (Ed) Panamericana; Buenos Aires, Argentina, 2008, pp. 654-673.

Gloyn A., Braun M., Rorsman P., et al. Type 2 Diabetes Susceptibility Gene TCF7L2 and Its Role in β -Cell Function. Ournal ListDiabetes[revista en la Internet]. Volume 58(4); 2009 Apr. Disponible en :<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2661580/>

Iniesta R., Guinó E., Moreno V. Acción de enzimas de restricción. Gac Sanit [revista en la Internet]. 2005 Ago [citado 2014 Oct 15]; 19(4): 333-341. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-91112005000400011&lng=es.

Llanes de Torres R., Nuevas evidencias en el manejo de la diabetes mellitus tipo 2. Rev. Medifam v.12 n 9 Madrid[revista en la Internet]. oct.-nov. 2002. Disponible en:http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1131-57682002000900006&lang=pt.

Lazo Y., Delgado D., Las incretinas: nueva alternativa terapéutica para el control glucometabólico de la diabetes mellitus de tipo 2. MEDISAN[revista en la Internet]. vol.16 2012. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192012000300015&lang=pt (Scielo: incretinas)

Palacios A., Durán M., Obregón O. Factores de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 y síndrome metabólico. Rev. Venez. Endocrinol. Metab. [revista en la Internet]. [Citado 2014 Oct 15]. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-31102012000400006&lng=es.

Patton K. Aparato Digestivo. En: Anatomía y Fisiología. Patton K., Thibodeau (Ed.). Ediciones Harcourt, Madrid. España 2010, pp. 755-757.

Rostan E., Polymerase Chain Reaction (PCR).[revista en la Internet]. 26 sept. 2014. Disponible en : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>

Zimdahl H., Ittrich C., Graefe U., et al. influence of TCF7L2 gene variants on the therapeutic response to the dipeptidylpeptidase-4 inhibitor linagliptin. MedClin, [revista en la Internet] Noviembre 2013.disponible en: DOI 10.1007/s00125-0143276-y.

